

バシトラシンの生合成機構に関する研究

| | |
|-----|---|
| 著者 | 石原 弘章 |
| 号 | 242 |
| 発行年 | 1982 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/16301 |

氏 名（本籍） いし はら ひろ あき
石 原 弘 章

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 242 号

学位授与年月日 昭和 58 年 3 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 バシトラシンの生合成機構に関する研究

論文審査委員（主 査）

教授 志村 憲 助 教授 高 橋 甫

助教授 伊 崎 和 夫

論文内容要旨

第1章 序 論

生体は、ジペプチドから蛋白質にいたるまで幅広い分子量にわたるペプチド化合物を合成している。それらを生合成機構の面からみると、蛋白質は、リボソーム、mRNA などの関与する複雑な合成系によって合成され、グルタチオンなどの低分子ペプチドは、それぞれのペプチド結合の合成に特異的に働く酵素によって合成されることが知られている。それでは、これらの中間に位置するペプチドはどのような機構で合成されるのであろうか。この様な物質の中にあつて、微生物の生産する抗菌性ペプチドの多くは、アミノ酸10個程度よりなり、環状ペプチド構造をとること、D型アミノ酸を含むこと、蛋白質には見出されないアミノ酸を含むことなど、単に分子量の面からだけではなく、その特異的構造からも生合成機構を知る上で興味ある物質群である。

本研究は、以上のような構造上の特徴をもつ抗菌性ペプチドの中から、*Bacillus licheniformis* の生産するバシトラシン (Fig. 1) をとりあげ、その生合成機構を解明することを目的とした。研究は、まず、バシトラシンが酵素系によって合成されることを示した後、酵素系の精製を行い、部分精製した酵素系を用いて、アミノ酸の活性化反応、ペプチド鎖の伸長様式、チアゾリン環の生合成反応等について検討した。

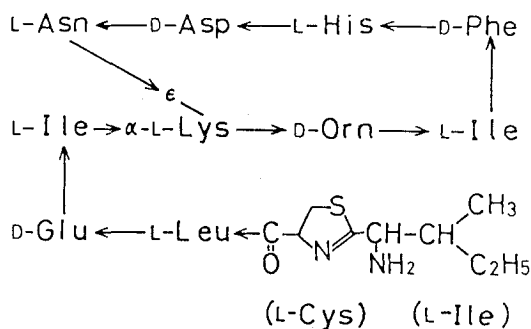


Fig. 1. Structure of Bacitracin A

第2章 無細胞系の調製，ならびに無細胞系におけるバシトラシン合成反応の基本的性質の検討

菌体をリゾチーム処理して溶菌破壊した後、 $12,000 \times g$ で遠心分離して得た上清 (粗抽出液) にバシトラシンの *de novo* 合成を行う活性が認められ、無細胞系を調製することができた。

バシトラシン合成の機構が蛋白質生合成の機構と異なることは、バシトラシン合成が、RNase A, あるいは蛋白質合成阻害剤であるクロラムフェニコールおよびピューロマイシンによってまったく影響を受けないことによって示された。さらに、粗抽出液を $105,000 \times g$, 90分間遠心すると、その上清に全活性が認められ、バシトラシンが可溶性の酵素系によって合成されることが明らかになった。

第3章 バシトラシン合成酵素の精製，および分画された3つの成分酵素（Component）のバシトラシン合成における役割

精製は $105,000 \times g$ 遠心の上清について，硫酸分画（35～55%），リン酸カルシウムゲル吸着，Sephadex G-200 ゲル濾過，ヒドロキシアパタイトクロマトの順に行い，約25～30倍にバシトラシン合成活性を高めることができた（Table 1）。

Sephadex G-200 によるゲル濾過の段階まではバシトラシン合成活性は特に分画されなかったが，ヒドロキシアパタイトのクロマトで，バシトラシン合成に必要な2つの画分 Peak I と Peak II に分かれた（Fig. 2）。両画分が活性化するアミノ酸の種類を検討した結果，Peak I

Table 1. Summary of Purification of Bacitracin Synthetase

| Enzyme fraction | Total protein (mg) | Purification (-fold) | Yield (%) |
|----------------------------|--------------------|----------------------|-----------|
| 1. 105,000 x g supernatant | 1,180 | 1.0 | 100 |
| 2. Ammonium sulfate | 464 | 1.6 | 64 |
| 3. Calcium phosphate gel | 135 | 3.1 | 36 |
| 4. Sephadex G-200 | 44 | 9.5 | 36 |
| 5. Hydroxyapatite | | | |
| Peak I | 16 | 28.5 | 15 |
| Peak II | 14 | 24.7 | 29 |

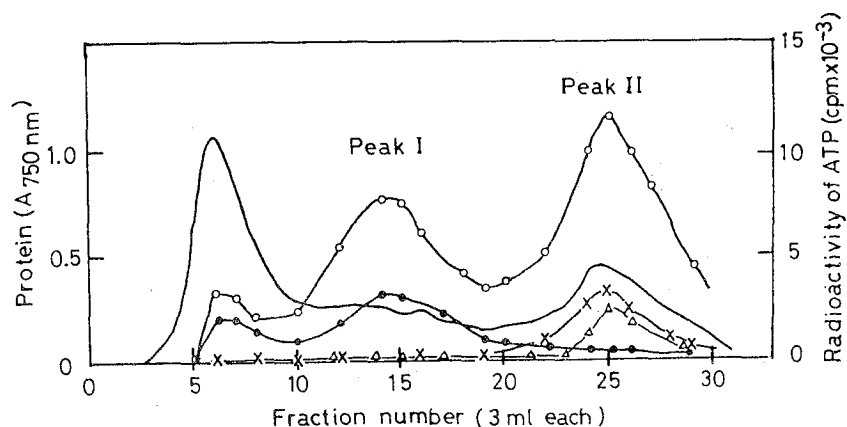


Fig. 2. Column Chromatography of the Sephadex G-200 Fraction on Hydroxyapatite. —, protein; L-isoleucine (O)-, L-cysteine (●)-, D-phenylalanine (X)-, and L-ornithine (Δ)-dependent ATP-PPi exchange activities.

はバシトラスシンの直鎖ペプチド部分に含まれるアミノ酸を、Peak II は環状ペプチド部分に含まれるアミノ酸を、それぞれ活性化することがわかった (Table 2)。両画分の分子量を推定するため、ショ糖密度勾配

遠心を行った結果、

Peak II は、L-リジンとL-オルニチンを活性化する酵素 (Component II) とL-ヒスチジンなど5種類のアミノ酸を活性化する酵素 (Component III) に分離した (Fig. 3)。

従って、直鎖ペプチド部分の合成に関与する酵素を Component I と呼ぶことにした。これらの3つの Component の性質をまとめて Table 3 に示した。

Table 2.

ATP- 32 PPi Exchange Activities of the Two Complementary Fractions

| Amino acid added | Concentration (mM) | Radioactivity of ATP (cpm) | |
|------------------|--------------------|----------------------------|---------|
| | | Peak I | Peak II |
| None | | 80 | 30 |
| L-Isoleucine | 5 | 10,950 | 10,010 |
| L-Cysteine | 5 | 7,230 | 820 |
| L-Leucine | 20 | 9,940 | 6,800 |
| L-Glutamic acid | 40 | 1,020 | 420 |
| L-Lysine | 30 | 200 | 8,110 |
| L-Ornithine | 5 | 600 | 6,390 |
| L-Phenylalanine | 5 | 460 | 4,970 |
| L-Histidine | 5 | 350 | 6,910 |
| L-Aspartic acid | 40 | 510 | 2,320 |
| L-Asparagine | 5 | 930 | 3,860 |
| D-Glutamic acid | 40 | 580 | 160 |
| D-Ornithine | 5 | 110 | 910 |
| D-Phenylalanine | 5 | 180 | 3,690 |
| D-Aspartic acid | 40 | 70 | 120 |

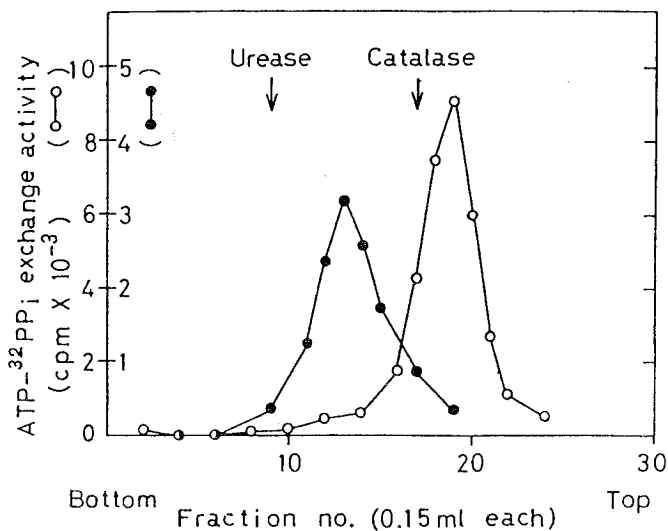


Fig. 3. Sucrose Density Gradient Centrifugation of Peak II.

ATP-PPi exchange activities dependent on a mixture of L-lysine and L-ornithine (○), and L-histidine (●).

Table 3. Features of Bacitracin Synthetase

| Enzyme fraction | Amino acid activated | Molecular weight |
|-----------------|---|------------------|
| Component I | L-Ile, L-Cys, L-Leu, L-Glu | 180,000 |
| Component II | L-Lys, L-Orn | 200,000 |
| Component III | L-Ile, L- and D-Phe, L-His, L-Asp, L-Asn | 380,000 |

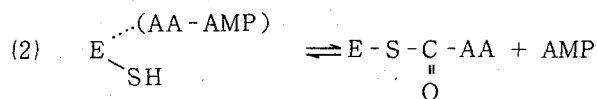
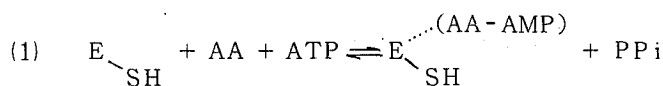
第4章 アミノ酸の活性化機構

バシトラシン合成は正リン酸によっては影響をうけないが、無機ピロリン酸 (PPi) および AMP によって阻害された。このことはアミノ酸の活性化が $ATP \rightarrow AMP + PPi$ の反応と共役していることを示している。実際に、バシトラシン合成酵素はアミノ酸に依存する ATP と PPi の交換反応を行うことが示され (Table 2), アミノ酸は ATP と反応してアミノアシル-AMP の形で活性化されることが明らかになった。アミノアシル-AMP の形成は, Sephadex G-50 によるゲル濾過およびニトロセルロース膜法を用いて確かめられた。

ニトロセルロース膜に吸着した酵素蛋白に結合した ^{14}C -アミノ酸の量の 50% 以上が 5% TCA で沈殿した酵素蛋白に結合していることがわかった (Table 4)。この結合は酸性条件で安定であるが、アルカリ条件, $NaBH_4$, ヒドロキシルアミンで分解されることから、酵素蛋白の SH 基にアミノ酸がチオエステル結合で結合していることがわかった。これらの結果から、アミノ酸の活性化反応は次のように進行するものと考えられる。

Table 4. Binding of ^{14}C -Labeled Amino Acids to Enzyme Protein

| Enzyme fraction | ^{14}C -Amino acid used | Amounts of enzyme-bound amino acid | |
|-----------------|---------------------------|---|----------------------------|
| | | Nitrocellulose filter-bound protein (pmole) | 5% TCA precipitate (pmole) |
| Peak I | L-Isoleucine | 5.6 | 5.8 |
| | DL-Cysteine | 11.2 | 8.0 |
| Peak II | L-Isoleucine | 5.3 | 5.3 |
| | L-Phenylalanine | 11.9 | 7.1 |
| | L-Histidine | 11.4 | 5.6 |



Eは酵素，AAはアミノ酸を示す。

各酵素の活性中心にSH基が存在することはSH阻害剤を用いた実験によって確かめられた。なお，各アミノ酸種が，それぞれ別々の活性中心で活性化されることは，混合基質法を用いて示すことができた。

第5章 ペプチド鎖の伸長機構

活性化され酵素蛋白質にチオエステル結合したアミノ酸がどのようにしてペプチド結合を形成し，ペプチド鎖がどのように伸長していくかについて検討した。

Sephadex G-200 によるゲル濾過の段階の酵素および ^{14}C -システイン（あるいは ^{14}C -リジン）を用い，反応系に加えるアミノ酸の種類をかえた時，5% TCA で沈殿する酵素蛋白質に結合する放射能（酵素に結合している中間ペプチドの生成量）を調べた結果が Table 5 および Fig. 4 である。また，反応系に加えるアミノ酸の組成をかえた時，酵素蛋白に結合しているペプチドを薄層クロマトグラフィーで分析した結果，バシトラシンのN末端から順次 CO-NH の結合方向にアミノ酸種を増していくに従って新しいペプチドのバンドが見出されることがわかった (Fig. 5)。

以上の結果などから，ペプチドの合成が，N末端アミノ酸のイソロイシンとシステインの間から始まり，ペプチド鎖が，バシトラシンのアミノ酸配列に従って順次 CO-NH の結合方向（C末端方向）に伸長すること，中間ペプチドが酵素蛋白にチオエステル結合したまま伸長すること，酵素蛋白には同時に種々の長さの中間ペプチドが結合していることが明らかになった (Fig. 6)。

以上のペプチド鎖の伸長様式と，抗菌性ペプチド・チロシジン，およびグラミシジンSの合成酵素にパンテセインが含まれているとの報告から考えて，バシトラシン合成酵素にパンテセインが含まれている可能性が考えられた。そこで，微生物定量法などを用いてパンテセインの定量を試みた。その結果，各Component 1モル当たり約1モルの4'-ホスホパンテセインが結合していることが明らかになった。パンテセイン部分はペプチド鎖の伸長反応に関与しているものと考えられる。

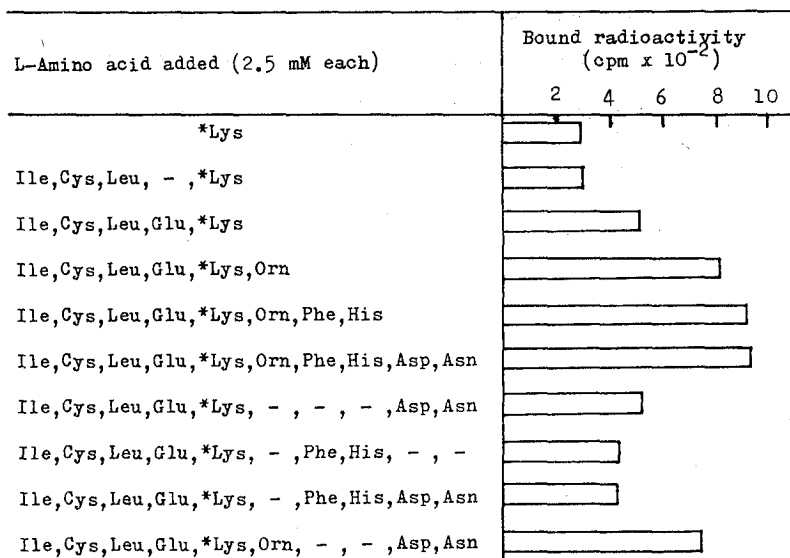
Table 5. Formation of Protein-Bound Nascent Peptide Chains.

| L-Amino acid added | Bound radioactivity (cpm) | |
|--|---------------------------|----------|
| | Expt.1* | Expt.2** |
| *Cys | 690 | 2,700 |
| Ile,*Cys | 480 | 3,320 |
| Ile,*Cys,Leu | 620 | 4,040 |
| Ile,*Cys,Leu,Glu | 1,350 | 8,270 |
| Ile,*Cys,Leu,Glu,Lys | 1,940 | 20,620 |
| Ile,*Cys,Leu,Glu,Lys,Orn | 2,360 | 17,110 |
| Ile,*Cys,Leu,Glu,Lys,Orn,Phe | 2,330 | 17,400 |
| Ile,*Cys,Leu,Glu,Lys,Orn,Phe,His | 2,650 | 17,850 |
| Ile,*Cys,Leu,Glu,Lys,Orn,Phe,His,Asp | 2,580 | 19,900 |
| Ile,*Cys,Leu,Glu,Lys,Orn,Phe,His,Asp,Asn | 1,900 | 14,370 |

* Amino acids : 1.7 mM each, enzyme : 33 μ g,

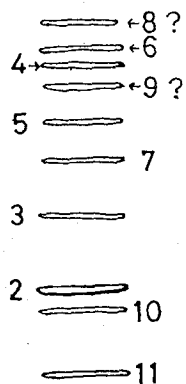
** Amino acids : 2.5 mM each, enzyme : 57 μ g,

Fig. 4. Effect of Bacitracin-Constituting Amino Acids on the Formation of Protein-Bound Nascent Peptide Chains Labeled with L-¹⁴C-Lysine.



Enzyme : 50 μ g,

————— Solvent
front



————— Origin

Fig. 5. Thin Layer Chromatography of ^{14}C -Labeled Peptides
Liberated from the Enzyme Protein by Alkali Hydrolysis.

The figures indicate the number of residues in each peptide.

Solvent system, $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ (4:1:2).

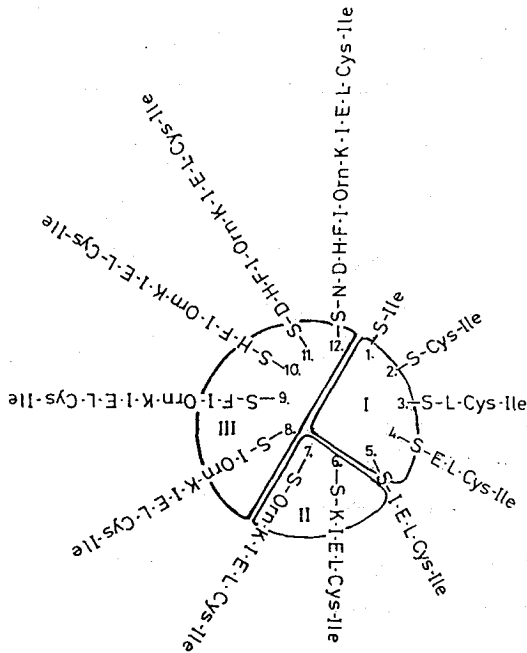


Fig. 6. Possible Positions of Intermediate Peptides on Bacitracin Synthetase.

I, II and III represent the three complementary Components of bacitracin synthetase. The activation sites of the constituent amino acids (numbered 1 - 12 from the N-terminal end of bacitracin) are indicated on the figure.

L, leucine; E, glutamic acid; I, isoleucine; K, lysine; F, phenylalanine; H, histidine; D, aspartic acid; N, asparagine.

第6章 チアゾリン環の生合成機構

バシトラシンのN末端部分にあるチアゾリン環がペプチド鎖の伸長のどの段階で形成されるかについて検討した。

酵素反応で、標識したジペプチドを調製し、これを MnO_2 酸化した時得られる物質が、バシトラシンFの酸加水分解物から得られる構造既知の Compound I (Fig. 7) に一致するかどうかを検討した。その結果、両者が一致したことより、ジペプチドが環構造をとっていることが確認された。次に、ジペプチドの形成反応と閉環反応とを分離して検出することのできる系を得るため種々検討を行ったが成功しなかった。このことは両反応が同時に進行する可能性を示している。

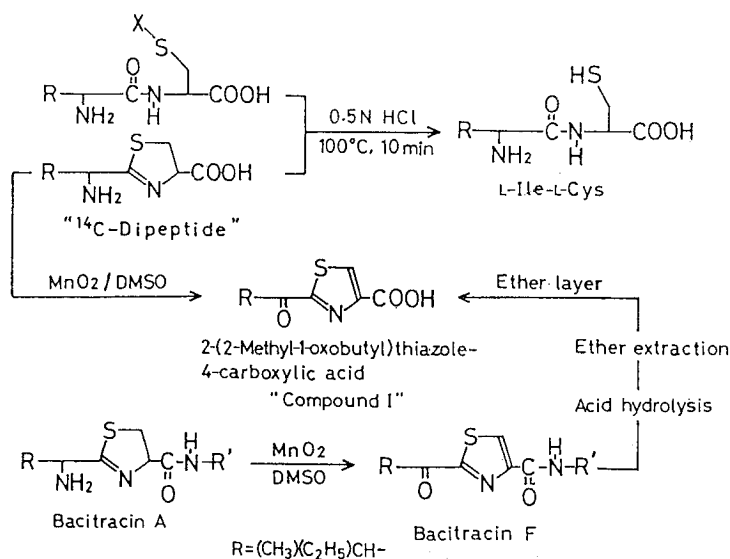


Fig. 7. Scheme for Identification of ^{14}C -Labeled "Dipeptide"
Oxidized with MnO_2 as Compound I.

第7章 D-アミノ酸の生成機構について

バシトラシン中の D-アミノ酸は酵素反応系に加えた L-アミノ酸から導かれるので、D 型への変換がいつ起こるかが問題となる。L- ^{14}C -フェニルアラニンを用いて酵素反応した時、酵素蛋白にチオエステル結合しているフェニルアラニンの立体配置を D-および L-アミノ酸酸化酵素を用いて決定した結果、ほぼ 100% が L 型のままであった。従って、D 型への変換は、チオエステル結合したフェニルアラニンがペプチド結合を形成する段階、あるいはそれ以後に起こる可能性が考えられた。

第8章 総 合 考 察

バシトラシンの生成反応は、12個のペプチド結合の形成、4個の L 型アミノ酸の D 型への変換、チアゾリン環の形成といった多くの反応からなる。この一連の複雑な反応が無細胞系において再現できたことから、これらの反応を行う酵素系が非常に組織化されていることが考えられた。実際に、酵素系の精製を試みた結果、バシトラシン合成酵素が Component I, II, III の3つの画分のみからなることが示された。このことは、アミノ酸を活性化する各酵素が Component の中で、定められた位置に固定されていることを示している。このような状態にある各アミノ酸活性化酵素の活性中心に、活性化されたアミノ酸がチオエステル結合しているとすると、アミノ酸活性

化酵素の配列順序に従ってアミノ酸が結合していくものと考えられる。このようなアミノ酸配列の決定様式は、抗菌性ポリペプチドの合成系に独得のものといえる。

アミノ酸は ATP により活性化されてアミノアシル-AMP を形成した後、チオエステルにより酵素蛋白質に結合するが、この反応形式は、蛋白質生成におけるアミノ酸の活性化、それに続く tRNA への結合、あるいは、アセチル基の活性化とそれに続く CoA への結合に類似した反応と考えることができる。しかし、バシトラシン合成酵素にパンテセインが含まれており、それがペプチド鎖の伸長に関与していると考えられる点は、他に例をみないものであり、抗菌性ペプチドの合成に独得のものである。

バシトラシン合成では、中間ペプチドはすべて酵素に結合した状態で伸長していくものと考えられるが、ペプチド鎖の伸長に従って、中間ペプチドは一定の 3 次構造をとって折りたたまれ、ドデカペプチドの合成された時には、環状ペプチド構造部分が合成できるような位置にリジン残基の ϵ -アミノ基が配置するものと考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

微生物の生産する抗菌性ペプチドの多くは、アミノ酸10個程度よりなり、環状構造をとること、D型アミノ酸を含むこと、タンパク質中には見出されないアミノ酸を含むなどの特徴ある性質を有することから、その生成機構を明らかにすることは、タンパク質生成との比較において興味深い課題である。本研究は、抗菌性ペプチドでアミノ酸12個よりなるBacitracin をとりあげ、その生成機構を解明することを目的とした。

Bacillus licheniformis の菌体よりバシトラシン合成酵素系を分離し、通常のタンパク質合成系とは全く異なる酵素反応系であることを明らかにした。

さらに、この合成酵素系を精製し、バシトラシン合成に必要な3つの酵素画分に分離し、それらをComponent I, IIおよびIIIと命名した。Component Iはバシトラシンの直鎖ペプチド部分のアミ

ノ酸を、IIは環状ペプチド部分のL-リジンとL-オルニチンを、IIIはL-ヒスチジンなど5種のアミノ酸を活性化することを明らかにした。

各酵素はATPの存在下でアミノ酸を活性化し、活性化されたアミノ酸は、酵素タンパク質の-SH基と結合してチオエステルの形で酵素に結合していることを証明した。各酵素画分には4-ホスホパンテセインが1モルずつ含まれ、これが活性化されたアミノ酸相互のペプチド結合生成に関与するものと推定した。ペプチドの合成はN-末端側(L-Ile)からC-末端側(L-Asn)へ伸長し、アミノ酸が12個結合した段階でL-AsnとL-Lysの間で環形成が行われることを明らかにした。また、チアゾリン環の形成は、L-Ile-L-Cysのジペプチドの段階で行われることも明らかにした。

以上の研究は、新しいペプチド結合生成酵素として生化学の分野に寄与するところが大きく、また、抗生ペプチドの生合成の面で実際面においても益するところが多く、著者に農学博士の学位を授与する価値があると判定する。

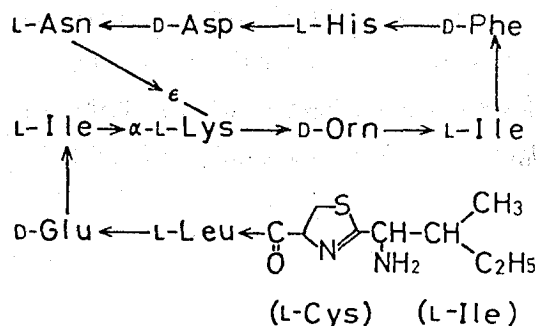


Fig. 1. Structure of Bacitracin A